

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-70182

(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 7/06

Z N A Z 8318-4H

A 6 1 K 39/395

D

P

C 0 7 K 7/08

A 6 1 K 37/02

A B C

審査請求 本請求 請求項の数11 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-158195

(71) 出願人 592130699

(22) 出願日 平成4年(1992)6月17日

ザ・レジエンツ・オブ・ザ・ユニバーシテ  
ィー・オブ・カリフォルニア

(31) 優先権主張番号 7 1 6 9 0 9

アメリカ合衆国、カリフォルニア州、

(32) 優先日 1991年6月18日

94812-3550、オークランド、トエンティ  
セカンド フロアー、レイクサイド ドラ  
イブ 300

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(72) 発明者 アラン ジェイ トビン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
90036、ロサンジェルス、サウス ハッセ  
リン アベニュー 850

(74) 代理人 弁理士 中村 静男 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クローン化グルタミン酸デカルボキシラーゼ

(57) 【要約】

【目的】 自己免疫疾患の診断及び治療に有用なグルタ  
ミン酸デカルボキシラーゼポリペプチドを提供する。【構成】 以下のアミノ酸配列を有する単離されたポリ  
ペプチド、又はその類似体、化学誘導体、若しくは医薬  
的に許容される塩。

X-Pro-Glu-Val-Lys-Y-Lys-Z

(式中、Xは1から10個のアミノ酸から選択されるア  
ミノ酸配列であるか、或いは省略されており；YはTh  
r又はGluであり；そしてZは1から8個のアミノ酸  
から選択されるアミノ酸配列であるか、或いは省略され  
ている)

(2)

特開第7 70182

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、又はその類似体、化学誘導体、若しくは医薬的に許容される塩、

X-Pro-Gln-Val-Lys-Y-Lys-Z  
(式中、Xは1から10個のアミノ酸から選択されるアミノ酸配列であるか、或いは省略されており；YはThr又はGlnであり、そしてZは1から8個のアミノ酸から選択されるアミノ酸配列であるか、或いは省略されている)

【請求項2】 XがLysを含み、YがGlnであり、そしてZがLeuを含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 Xが更にMetを含み、そしてZが更にArg及びLeuを含む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項4】 XがLysを含み、YがThrであり、そしてZがLeuを含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 Xがアミノ酸配列Ala-Met-Met-Ile-Ala-Arg-Phe-Lys-Met-Pheであり、そしてZがアミノ酸配列Gly-Met-Ala-Ala-Leu-Pro-Arg-Leuである、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項6】 Xがアミノ酸配列Ser-Ile-Met-Ala-Ala-Arg-Tyr-Lys-Tyr-Pheであり、そしてZがアミノ酸配列Gly-Met-Ala-Ala-Val-Pro-Lys-Leuである、請求項4に記載のポリペプチド。

【請求項7】 請求項1に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列。

【請求項8】 DNAである、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】 cDNAである、請求項8に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】 請求項1のポリペプチドに対する抗体。

【請求項11】 モノクローナル抗体である、請求項10に記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】 本出願は、1990年9月21日出願のU. S. Serial No. 07/586, 536の一部継続出願である。

【0002】 本発明はNational Institutes of Healthからの基金NS22256によって支援されたものである。アメリカ合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

## 【0003】

【産業上の利用分野】 本発明はグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD65)ポリペプチドの発現のために、

GAD65で宿主生物を形質転換する組み換えDNA手法の使用に関する。また、GAD65ポリペプチドを、自己免疫疾患において診断的及び治療的に使用する方法も包含する。

## 【0004】

【従来の技術】 インシュリン依存性糖尿病(insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM; (型糖尿病))は、最も普遍的な代謝疾患の一つである。アメリカ合衆国では、IDDMはおおよそ300から400人に1人の割合で見られ、疫学的研究によると、この疾患は増加していることを示唆している。この疾患は膵臓のインシュリン産生β細胞の自己免疫破壊の結果生じる。更に特定すれば、この疾患の始まる前段階は、リンパ球が膵臓のランゲルハンス島に浸潤し、β細胞を選択的に破壊する、“インスリノミス”という状態を特徴とする。典型的なIDDMの過血糖症は、インシュリン産生性β細胞の少なくとも80%が壊された後に、初めて現れる。残りのβ細胞は次の数週間には破壊される。

【0005】 インシュリン治療によって大半のIDDM患者は普通の生活を送ることができるが、この補充は不完全なものであって、代謝恒常性を完全に元に戻すものではない。従って、目、腎臓、心臓、及びその他の器官の機能低下に至る深刻な合併症が、インシュリン治療を受けているIDDM患者には多い。このためには、β細胞破壊の開始時と、実際にインシュリン補充が必要となる時(即ち、β細胞の80%が破壊されたとき)との間の潜伏期間を伸ばすこと(例えば、免疫抑制剤の投与によって)が極めて望ましい。従って、β細胞破壊の開始を決定する診断テストがあれば、医者が潜伏期間を伸ばすための免疫抑制剤を投与することができ(Silverstein et al., New England Journal of Medicine, 319:599-604, 1988)、それによってインシュリン補充による副作用の開始を遅らせることができる。

【0006】 IDDM患者の多くは、64 kD分子(Baekkeskov et al., J. Clin. Invest. 79:926-934, 1987; Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990)、島細胞細胞質(islet cell cytoplasmic:ICA)分子又は島細胞表面(islet cell surface:ICSA)分子(Boltzkoel et al., Lancet, 1:668-672, 1980)、或いはインシュリン(Palmer et al., Science, 222:1137-1139, 1983; Atkinson et al., Diabetes, 35:894-898, 1986)に対する抗体を含む血清を有している。Atkinsonとその共同研究者ら(Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990)は、ヒト血清中における64 kD分子に対する抗体の存在が、IDDM症状が実際に起きる始まりについての、最も初期でかつ最も信頼できる指標であることを示した。

【0007】 最近になって、Baekkeskovとそ

33

特開平7-70182

の共同研究者らは、61kD分子と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) とは幾つかの共通の抗原エпитローンを有しており、従ってこれらは同じものであるか、或いは非常によく似た分子である、ということを確認した。この同定は重要な発見ではあるが、GADの分子生物学に関する知識が未知である限りは、この情報をIDDM予知の診断法として用いることは極めて危念であり、かつ限定されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、大量の61kD分子、又は61kD分子と抗原的に実質的に同一なGAD分子をクローニングし、次いで生産することができれば、IDDM予知のための診断キットの開発が可能となろう。本発明は、かかる結果を達成するための手段を提供する。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、組み換えDNA手法を用いて真核性GADはポリペプチドの生産が可能であり、かつGADはポリペプチドを自己免疫疾患の患者の診断及び治療に用い得るという知見に基づいてなされた。特定すれば、クローン化真核性GADはポリペプチドを、インシュリン依存性糖尿病(IDDM)を有する患者、或いは有する危険性のある患者の診断に用いることに関する。

【0010】本発明の主な利点は、天然の真核性GADはポリペプチドをその他の真核性非-GADはポリペプチドから分離する際に、その分離に関して生じる問題を回避しつつ、天然源から精製したものに対応する真核性GADはポリペプチドの容易な生産源を当業界に提供することである。その他の真核性非-GADはポリペプチドが存在しないということは、GADはポリペプチドと特異的に反応する抗体のみを検出する試験システムの開発が可能となるので、重要なことである。

【0011】宿主細胞中において真核性GADはポリペプチドを提供する他の利点は、そうすることによって天然源から現在実際に得られているよりも、はるかに大量のポリペプチドを得ることが可能となることである。その結果、本発明のポリペプチドを用いてIDDMのような自己免疫疾患を有する患者をより正確に分類することが可能となるばかりでなく、診断システムに使用するための商業的に使用可能な量のGADはポリペプチドを提供することも可能となる。

【0012】本発明は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD65) に対する自己抗体と結合するための、1又はそれ以上のエピトープ (抗原決定基) の1次構造コンホメーションの一部又は全てを有するポリペプチドの生産を可能にする組み換え手法によって、遺伝的物質を操作することに関する。これらのポリペプチドは、自己反応する自己抗体を免疫学的に使用するのは極めて有用である。なぜなら、このような自己抗体は、インシ

ュリン依存性糖尿病や"スライッフマン (stillman)" 症候群のような自己免疫疾患の指標となるからである。これらのポリペプチドは、GAD機能を変えようとするスクリーニング区画として、また、GADを診断的に検出するために用いるポリクローナル及びモノクローナル抗体の製造用としても使用できる。

【0013】DNAベクター中にサブライシングするための真核性GADはポリペプチドをコードする特異的DNA配列の作製は各種の方法を用いて実施できる。例えば、(1) 真核生物のゲノムDNAから、本鎖DNA配列を単離する；(2) 興味のあるポリペプチドにとって必要なコドンを提供するためのDNA配列を化学的に製造する；及び(3) 真核生物ドナー細胞から単離したmRNAの逆転写によってin vitroで二本鎖DNA配列を合成する、といった方法を含む各種の方法を用いることができる。後者の場合、実際には、cDNAと一般に呼ばれる、mRNAと相補的な二本鎖DNAが形成される。

【0014】所望のポリペプチド産物のアミノ酸残基の全配列が公知の場合には、DNA配列の製造方法はしばしば選択の問題である。所望のポリペプチドのアミノ酸残基の全配列が公知でない場合には、DNA配列の直接製造は不可能で、選択しうる方法はcDNA配列の形成である。興味のあるcDNA配列を単離するための標準的方法には、高レベルでの遺伝子発現を有するドナー細胞中に豊富にあるmRNAの逆転写に由来する、プラスミド運搬性のcDNAライブラリーを形成することがある。ポリメラーゼ鎖反応法と組み合わせると、まれな発現産物でもクローニングすることができる。ポリペプチドのアミノ酸配列の重要な部分が公知の場合には、ターゲットのcDNA中に存在すると推定される配列と重複するような、ラベルした一本鎖又は二本鎖DNA又はRNAプローブ配列を作成して、あらかじめ本鎖形に変性しておいたcDNAのクローン化コピー上で行うDNA/DNAハイブリダイゼーション法を用いることができる (Jay et al., Nucleic Acid Research, 11:2325, 1983)。

【0015】ラベルした混合合成オリゴヌクレオチドプローブを用いることによって (ここで各プローブは、変性化二本鎖DNAの異種混合物を含むハイブリダイゼーションサンプル中において、特定のDNA配列の完全な相補体である可能性がある)、ハイブリダイゼーション法は組み換え体クローンをスクリーニングするのに有用である。このようなスクリーニングのためには、ハイブリダイゼーションは、一本鎖DNAか、或いは変性化二本鎖DNAのいずれかで実施するのが好ましい。このような方法は、興味のあるポリペプチドと関連するmRNA配列の量が極めて少しか存在しない材料に由来するcDNAクローンを検出する際には特に有用である。言い換えると、非-特異的な結合を避けるための緊縮的

5

(stringent) ハイブリダイゼーション条件を用いることによって、例えば、ターゲットDNAがその完全な相補体である、混合物中の1個のプロープとハイブリダイゼーションすることによって、特定のcDNAクローンをオートラジオグラフで可視化することができるようになる (Wallace et al., Nucleic Acid Research, 9:819, 1981)。

【0016】更に、各種cDNAをマセーサイト (macrotiter) に注入して、cDNA遺伝子産物の発現が起きるのに十分な時間をおき、そして所望のcDNA発現産物の存在を、例えばGAD65に、特異的な抗体を用いるか、或いはGAD65酵素活性の機能的アッセイを用いることによって試験することにより、GAD65 cDNAライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0017】若しくは、GAD65に対する抗体を用いて、少なくとも1個のエピトープを有するGAD65ポリペプチドに対して、cDNAライブラリーを間接的にスクリーニングすることができる (Chang and Gottlieb, J Neurosci., 3:2123, 1986)。このような抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル由来であり、GAD65 cDNAの存在を示す発現産物を検出するのに使用することができる。GAD65のN-末端部分の最初の100アミノ酸にみられるエピトープに対する抗体が好ましい。

【0018】遺伝子組み換えにおいて使用できる、特定のDNA配列作製のための上記3つの方法のうちでは、ゲノムDNA単離を用いる方法が最も一般的でない。これは、哺乳動物ポリペプチドを微生物の発現で得たいという場合には、イントロンの存在のために、特にそうである。

【0019】本発明は、GAD65に対する抗体への少なくとも1個のエピトープを有する1次構造コンホメーション、即ち、アミノ酸残基の連続的配列、の一部又は全てを有する、GAD65の新規ポリペプチドを提供する。

【0020】GAD65に対する自己抗体を検出するためには、完全なGAD65よりもむしろ本発明のポリペプチド断片を用いることができる。GAD65ポリペプチドに用いる場合の“ポリペプチド”の語は、GAD65に対する自己抗体へのエピトープを有するいかなるアミノ酸配列を示すが、ここで該アミノ酸配列は、本発明のcDNA配列の一部又は全てによってコードされる。

【0021】本発明のDNA配列の微生物発現から得られるポリペプチドは、他の真核性ポリペプチド、或いは天然の細胞環境中で、又は血漿 (plasma) や尿のような細胞外液体中で、さもなければGAD65と関連している他の汚染物を含まない、という特徴を更に有している。

【0022】本発明者による研究により、GAD65とGAD67とは別々の遺伝子でコードされるものであり、例えば、共通のゲノム性配列が転写後、又は翻訳後に修飾されることによって生産されるのではないことが明らかに確立された。GAD65とGAD67とは別々の遺伝子によ

6

特開平7 70182

ってコードされることを示す証拠には以下のものが含まれる：(a) GAD65及びGAD67 cDNAの間の正確に一致する部分の最大の連続した配列は、たった17ヌクレオチドの長さである、(b) GAD65及びGAD67からのcDNAは、低い厳格調節 (stringency conditions) 下で (2.0 x SSC, 0.01% SDS, 23°C) お互いにクロスハイブリダイゼーションしないし、またお互いのmRNAともクロスハイブリダイゼーションしない、そして (c) GAD65及びGAD67 cDNAは、それぞれGAD65及びGAD67をコードする単離したゲノム性クローンとクロスハイブリダイゼーションしない。

【0023】“宿主”の語は、原核生物のみでなく、酵母菌、糸状菌のような真核生物、また植物及び動物細胞のように、複製可能で、かつ真核性GAD65のイントロンを含まないDNA配列を発現することのできるものを意味する。しかしながら、宿主生物としては原核生物が好ましい。

【0024】“原核生物”の語は、GAD65の発現のための遺伝子で形質転換又はトランスフェクションされる全てのバクテリアを含む。原核生物宿主は、グラム陰性菌や、例えば *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* 及び *Bacillus subtilis* などのグラム陽性菌を含む。

【0025】GAD65ポリペプチドをコードする組み換えDNA分子によって、当業者に公知の方法を用いて、宿主を形質転換又はトランスフェクションすることができる。特に好ましいのは、GAD65コーディング配列を含むプラスミド又はウイルスを、それぞれ原核生物の形質転換又はトランスフェクションのために用いることである。

【0026】融合し、作動的に (operably) 連結した遺伝子を調製し、またそれらをバクテリア中で発現させる方法は当業者に公知である (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。ここで記載する遺伝的情報物及び方法は、原核生物宿主中でのGAD65の発現に用いることができる。

【0027】一般に、挿入された真核生物性遺伝子配列の効率よい転写を容易にするプロモーター配列を含む発現ベクターを、宿主との関連で使用する。発現ベクターは典型的には複製起点、プロモーター、及びターミネーター、並びに形質転換細胞の表現型選択を与えることのできる特定遺伝子を含む。形質転換された原核生物宿主は、発酵槽中で成長させて、当業者に公知の方法によって最適成長条件で培養することができる。次いで本発明のポリペプチドを成育培地、細胞分解物、又は細胞膜分離から単離することができる。

【0028】微生物で発現された本発明のポリペプチド

7

の単離及び精製は、例えば、アレイバッチ・ブロッティング分離や、モノクローナル又はポリクローナル抗体の使用を含む免疫的分離のようないかなる慣用的方法によってもよい。

【0029】GAD65のアミノ酸残基の配列を既に提供したことによって、本発明は、1又はそれ以上のアミノ酸残基の種類又は位置において天然型と異なっており、かつ天然型ポリペプチドの幾つかの又は全てのエピトープを共有する、GAD65のポリペプチド類似体又は誘導体の宿主発現をコードするDNA配列の製造を提供する。

【0030】本発明の新規なDNA配列は、GAD65に対する自己抗体と反応することができる1又はそれ以上のエピトープのための1次構造コンホメーションの少なくとも一部を有するポリペプチドを、原核生物又は真核生物宿主細胞中で発現させるのに有用な全ての配列を含み、該GAD65は以下のものと理解される。(a) 図2〜4又は図5〜8に示されるDNA配列、又はその相補的鎖；(b) (a)で定義したDNA配列又はその断片とハイブリダイズするDNA配列；及び(c) 遺伝暗号の縮重のために、(a)及び(b)で定義したDNA配列とハイブリダイズするDNA配列。特に(b)で定義したものは、GAD65の対立遺伝子変異型をコードするゲノムDNA配列と理解される。(c)では特に、そのDNA配列が、無脊椎動物宿主中でのmRNAの翻訳を容易にするコドンを導入するような、GAD65、GAD65断片、及びGAD65類似体をコードするDNA配列を製造するものと理解される。

【0031】本発明のcDNA配列は本質的に全てのヒト又はラットGAD65分子をコードするものである。40  
で、これからcDNAの小さいポリペプチド断片、又はヒト又はラットGAD65に対する自己抗体のための少なくとも1個のエピトープをコードする対応するcDNA配列を調製し、サブクローニングし、そして発現させることは今や日常的なことである。次いでクローン化ポリペプチド上にこのようなエピトープが存在することを、例えばGAD65に対する自己抗体を有する患者からの血清を用いて確認できる。このような小さいペプチドの例としては、GAD65のN末端からの最初の約100アミノ酸がある(図5〜8に示す)。このアミノ酸配列には本質的にGAD65が欠けている。

【0032】本発明のGAD65はイムノアッセイに用いるのに特に適しており、液相又は固相担体に結合して使用できる。更に、これらのアッセイに用いるGAD65は各種の方法で検出できるように標識することができる。

【0033】本発明のGAD65を用いるイムノアッセイの例としては、直接又は間接法における、競合的又は非競合的イムノアッセイがある。このようなイムノアッセイの例としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、サンドイッチイムノアッセイ及びウェスタンブロットアッ

8

セイがある。本発明のGAD65と結合する抗体の検出は、生化学的サンプルでの免疫組織化学的アッセイを含む、順相、逆相、又は同時モードのいずれかでを行うイムノアッセイを用いて実施することができる。用いるGAD65の濃度は、イムノアッセイのタイプ及び使用する検出可能な標識の性質によって変化する。しかしながら、どのようなタイプのイムノアッセイを用いるにせよ、使用するGAD65の濃度は定法を用いて、当業者には容易に決定できる。

【0034】本発明のGAD65は多くの種類の担体と結合させて、このポリペプチドと特異的に反応する抗体の存在を検出することからできる。よく知られた担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、塩化ポリビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、フィコリン、アミコース、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガコース、及びマグネタイドがある。担体の性質は本発明の目的のためには可溶性又は不溶性のいずれであってもよい。当業者はGAD65と結合するためのその他の適当な担体を知ることができるし、また定法によってこれを確認することができる。50

【0035】多くの異なる標識及び標識法が当業者には公知である。本発明に使用できる標識のタイプの例としては、酵素、放射性同位体、コロイド金属、蛍光化合物、化学発光化合物、及び生物発光化合物がある。

【0036】更に、本発明のポリペプチドはGAD酵素活性を測定することによって、GAD65に対する抗体を検出することができる。例えば、GAD65と、GAD65に対する抗体を有している疑いのある標本とを、一定期間、GAD65と抗体との間に結合を起こさせるに十分な条件下にインキュベーションする。反応生成物を沈殿化して、このGAD酵素活性を試験する。

【0037】本発明の目的のためには、本発明のGAD65と結合する抗体は、各種の生物液体及び組織中に存在する。検出可能な量のGAD65に対する抗体を含むいかなるサンプルも用いることができる。普通、サンプルは尿、唾液、脳脊髄液、血液、血清などの液体であるか、或いは組織、癌などの固体又は半固体である。

【0038】本発明のアッセイに用いる物質は、そのままキットの製造にも適している。このようなキットは、バイアル、チューブなどの1又はそれ以上の容器手段を密に閉じ込めるために仕切られた担体手段を含み、該容器手段の各々はこの方法で使用する別々の要素のうちの1つを含む。例えば、容器手段のうちの1つは担体と結合したGAD65を含む。第2の容器は可溶化、検出可能な第2の抗体を凍結乾燥又は溶液の形で含む。

【0039】更に、担体手段はまた複数の容器を含み、各容器は異なる、所定量のGAD65を含む。次いでこの後者の容器を用いて標準曲線を描き、これに未知の量のGAD65に対する自己抗体を含むサンプルから得られた結果を挿入する。50

リ

【0040】キットを使用するに当たって使用者がしなければならないことは、測定可能であるが、未知の量のGAD65に対する自己抗体を含む、あらかじめ測定した量の検出用サンプルと、第1の容器中に存在するあらかじめ測定した量の抗体結合したGAD65と、第2の容器中に存在するあらかじめ測定した量の検出可能な標識化第2抗体とを容器に加えることである。若しくは、検出不能な標識化GAD65を容器に付けて提供し、これにサンプルと、検出可能な標識化第2抗体とを加えることもできる。適当な時間インキュベーションした後、免疫複合体が形成され、これを上清液から分離し、免疫複合体又は上清液を、放射能カウンタするか、又は酵素基質を加えて発色させるなどによって検出する。

【0041】"改良する (ameliorate)" の語は、患者が受け取る治療において自己免疫応答の有害な効果を減少することを意味する。"治療的に有効な" の語は、使用するGAD65ポリペプチドの量が自己免疫応答による疾患誘発を改良するのに十分な量であることを意味する。

【0042】本発明の組み換えGAD65ポリペプチドは、GAD65に対する自己免疫応答を有する患者の治療に用いることもできる。このような治療は、例えば、組み換えGAD65ポリペプチドを投与することによって実施できる。このような投与には非標識化又は標識化GAD65ポリペプチドを用いることができる。非標識化GAD65ポリペプチドを用いるのが有利な場合には、例えば、免疫応答を刺激するには小さすぎるが、自己免疫応答の継続を束縛したり/ロックしたりするには十分大きい断片の形でGAD65ポリペプチドを投与する。例えば、GAD65をエプトマーサイズのペプチド（典型的には5-12アミノ酸の長さ）に酵素的に消化して、自己免疫疾患を有する患者の体液中、又は免疫細胞の表面上に存在するFab結合部分に結合させる。

【0043】或いは、本発明の組み換えGAD65ポリペプチドは、治療剤として投与することができる。これらの治療剤は本発明のGAD65ポリペプチドと直接又は間接にカップリングさせることができる。間接的カップリングの一例はスパーサー部分を用いることである。このスパーサー部分は可溶性又は不溶性であることができる (Diener et al., Science, 231 148, 1986)。ターゲット部分でGAD65ポリペプチドから医薬の放出をできるように選択される。免疫治療用に本発明のGAD65ポリペプチドとカップリングすることができる治療剤の例としては、医薬、放射性同位体、レクチン、及び毒素がある。

【0044】本発明のGAD65ポリペプチドと結合することができる医薬には、マイトマイシンC、ダウノルビシン、及びビンブラスチンのような古典的に医薬と呼ばれていたものを含む。

【0045】免疫治療用に放射性同位体と結合した本発

56]

特開第7-70182

10

明のGAD65ポリペプチドを使用する際には、白血球の分布、安定性及び放射のような要因によって、ある同位体が他の同位体よりも好ましいことがある。自己免疫応答によって、ある放射体が他のものよりも好ましいことがある。一般に、免疫治療では $\alpha$ 及び $\beta$ 粒子放射線の放射性同位体が好ましい。 $^{111}\text{In}$ のような近距離、高エネルギーの $\alpha$ 放射体が好ましい。本発明のGAD65ポリペプチドと結合することができる放射性同位体の例としては、 $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{125}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{125}\text{Br}$ ,  $^{213}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Pb}$ ,  $^{90}\text{Sc}$ ,  $^{213}\text{Po}$ 及び $^{213}\text{Re}$ がある。

【0046】レクチンは通常植物から単離されるタンパク質であって、特定の糖部分と結合する。多くのレクチンが細胞を凝集させ、リンパ球を刺激することができる。しかし、リシン (Lectin) は免疫治療に用いられてきた毒性レクチンである。これは、毒性の原因であるリシンの $\alpha$ -ペプチド鎖を、抗体分子と結合させて、毒性効果を特異的に配給することによって達成できる。

【0047】毒素は植物、動物、又は微生物によって産出される毒性物質であって、十分な投与量でしばしば死に至る。ジフテリア毒素は治療的に用い得る *Corynebacterium diphtheriae* によって産出される物質である。この毒素は $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットからなっており、適当な条件下に分離できる。毒素A部分は、GAD65ポリペプチドと結合させて、GAD65ポリペプチドに対するリセプターを発現する白血球への部分特異的な配給に用いられる。

【0048】本発明のGAD65ポリペプチドとカップリングすることができるその他の治療剤は、*ex vivo* 及び *in vivo* の治療法共に、公知であり、又は当業者によって容易に確認できる。

【0049】本発明はまた、この疾患を有する患者、又は有する危険のある患者における疾患過激を改良するために治療的に投与することのできるポリペプチドに関する。各種アミノ酸を表すために用いる便宜的な一字の記号は以下の通りである：

Phe : F	Leu : L	Ile : I	Met : M
Val : V	Ser : S	Pro : P	Thr : T
Ala : A	Try : Y	His : H	Gln : Q
Asn : N	Lys : K	Asp : D	Glu : E
Cys : C	Trp : W	Arg : R	Gly : G

【0050】本発明のポリペプチド配列は、ヒトGAD65、ヒトGAD67、及びピコマウイルス、コクサッキーウイルスヘルペス、レクチンハク質のアミノ酸配列と比較することによって同定された。P2-Cポリヌクレオチド

11

特開平7 70182

は複製複合体と結合したウィルス膜中で一定の役割を演じている。これらの分析によって、いずれのGAD65分子とコクサッキーウィルスとの間にも広範な配列類似性のあることが明らかとなった。GAD65とP2-Cポリペプチドの6個の隣接するアミノ酸残基からなる中心ポリペプチドは、そのアミノ酸配列が同一である。実際、\*

12

\*ポリペプチド中の24アミノ酸のうち、19個が同一であるが、又は保存されている (conserved)。更に、高電荷密度と、この領域に高い抗原性を与えているプロリン残基の存在がある (表1)。

【0051】

【表1】

表1

## タンパク質

## アミノ酸配列

ヒトGAD <sub>67</sub>	S	I	H	A	A	R	Y	K	F	P	E	V	K	E	K	G	H	A	A	V	P	K	L
ヒトGAD <sub>65</sub>	S	I	H	A	A	R	Y	K	F	P	E	V	K	E	K	G	H	A	A	V	P	K	L
コクサッキーウィルス	S	I	H	A	A	R	Y	K	F	P	E	V	K	E	K	G	H	A	A	V	P	K	L
P2-C	S	I	H	A	A	R	Y	K	F	P	E	V	K	E	K	G	H	A	A	V	P	K	L

表1において、実線は同一のアミノ酸を囲み、破線は類似の電荷、極性、又は疎水性を有するアミノ酸残基を囲む。

【0052】この共通のポリペプチド領域の発見は、糖尿病の促進における“分子模倣 (molecular mimicry)” としての病原学的役割を裏付ける。かくして、遺伝的にIDDMの疑いのある患者はコクサッキーウィルスで感染され、コクサッキーウィルスポリペプチドに対する免疫応答は、患者のβ-細胞中の類似のGAD配列に対する交差反応的免疫応答という結果をもたらす。抗原的に類似のGADポリペプチドによって免疫応答は維持され、その結果β-細胞が実際に破壊されて、次いでIDDMを呈するようになる。

【0053】現在のところ、胰岛β-細胞の消失は細胞の自己免疫応答によって仲介されると信じられている。その結果、本発明のポリペプチドはこのようになされる細胞性の自己免疫応答をブロックする能力を有しているはずである。自己免疫疾患の複雑さのために、本発明のポリペプチドをこのような疾患の改良のために用いることができる多くの治療様式を企及することが可能である。従って、抗原提供細胞 (antigen presenting cell: APC) 表面上の自己免疫抗原を提供する特定のT細胞リセプター (TCR) 又はMHCリセプターによる認識をブロックするために、本発明のポリペプチドを用いることが可能である。例えば、患者に本発明のポリペプチドを与えて、これがMHCリセプターの抗原の裂け目 (pit) に存在している自己免疫抗原と置き換わることによって、或いはTヘルパー細胞の表面上の適当なTCRとの直接的相互作用によって、このような認識の阻害が起きるのかも知れない。この後者のTCRとの直接的相互作用による治療の試み

は、高濃度の可溶性ポリペプチドを用いることによる大領域寛容 (high-zone tolerance) の誘導によって達成することができる。

【0054】若しくは、本発明のポリペプチドは、自己認識を修復し、それによって自己免疫疾患を改良するためにT-サブプレッサー細胞集団を刺激するために用いることができる。T-サブプレッサー細胞集団の刺激は、例えば、MHCリセプターの裂け目にある自己免疫抗原上に存在するエピトープに特異的な1個の可変領域と、CD8リセプター上に存在するエピトープに特異的な第2の可変領域とを有する二特異的 (bi-specific) 抗体を用いることによって達成できる。本発明のポリペプチドに特異的な抗体の生産は当業者には慣用的であり、2又はそれ以上のエピトープに特異性を有する二特異的抗体の生産もまた当業者には慣用的である。

【0055】本発明のポリペプチド類似体は抗原提供のレベルでの自己抗原の認識と融合するようにデザインできる。MHC分子は1個のペプチド結合部位を含んでいるので、疾患-関連性MHC分子とは高い親和性で結合するが、疾患-誘発性T-ヘルパー細胞を活性化しないポリペプチドをデザインすることが可能である。このようなポリペプチドは自己-抗原認識のための拮抗剤として作用する。このようなアプローチの先例は、それ自体は非-免疫原性であるマウスリゾチームポリペプチドが、ニワトリ卵白リゾチームからの免疫原性ポリペプチドとのMHCの結合と融合することができ、それによってこのポリペプチドによるT細胞活性化を減少させることができる、という観察に由来する (Adorini et al., Nature, 334:623-624, 1988)。同様に、有効なポリペプチド類似体をコクサッキーウィルス感染のためのこのような治療的アプローチは、実験的自己免疫脳脊髄炎 (exper

13

時間半 7 7 0 1 8 2

imental autoimmune encephalomyelitis (EAE) のような自己免疫疾患に用いられてきた (Wraith et al., Cell, 59:243, 1989; Urban et al., Cell, 59:251, 1989).

【0056】本発明のポリペプチドにおけるアミノ酸を表すために用いる一字の記号は当業者に慣用的に用いられているものである。“類似体”の語は、ここで提供されるポリペプチドと実質的に同一なアミノ酸配列を有し、かつその1又はそれ以上のアミノ酸が化学的に類似したアミノ酸で置換されたポリペプチドをいう。例えば、グリニンやセリンのような極性アミノ酸は、他の極性アミノ酸で置換できし、或いはアスパラギン酸のような酸性アミノ酸は、グルタミン酸のような他の酸性アミノ酸で置換できし、或いはリシン、アルギニンやヒスチジンのような塩基性アミノ酸は、他の塩基性アミノ酸で置換できし、或いはまたアラニン、コイシンやイソロイシンのような非極性アミノ酸は、他の非極性アミノ酸で置換することができる。

【0057】“類似体”の語はまた、本発明のポリペプチドから1又はそれ以上のアミノ酸が欠失されたか、或いはこれに付加されているが、このようなペプチドと実質的に相同なアミノ酸配列を保持しているポリペプチドをも意味する。実質的な配列相同とは50%以上のいかなる相向をいう。“断片”の語は、少なくとも6アミノ酸残基を有する、ここで同定するポリペプチドのより短い形のものをいい、この断片は小島浸潤性Tリンパ球 (islet infiltrating T lymphocytes: IITLs) の増殖を刺激することができるか、或いは刺激性ポリペプチド断片によるこのような細胞の刺激を阻害することのできる断片である。

【0058】“化学的誘導体”の語は、本発明のポリペプチドに由来するいかなるポリペプチドも意味し、ここでポリペプチド中に存在するアミノ酸残基の側鎖官能基の反応によって、1又はそれ以上のアミノ酸を化学的に誘導体化したものをいう。従って、“化学的誘導体”とは、1又はそれ以上の化学的工種によってここで同定する配列又はポリペプチドから誘導されるポリペプチドである。このような誘導体は、例えば、避難のアミノ基を誘導体化してアミン塩酸塩、p-トルエンサルフォアミド、ベンゾキシカルボアミド、ε-ブチルオキシカルボアミド、チオウレタン型誘導体、トリフクロアセチルアミド、クロロアセトアミド、又はフォルムアミドを形成するような分子を含む。避難のカルボキシル基は誘導体化して、塩、メザル又はエチルエステル、又はその他の型のエステル又はヒドラジドを形成する。避難の水酸基は誘導体化してO-アシル又はO-アルキル誘導体を形成する。ヒスチジンのイミダゾール置素を誘導体化してN-1-m-ベンジルヒスチジンとすることができる。20 20の標準アミノ酸の天然に起るアミノ酸誘導体を1又はそれ以上含むポリペプチドも化学的誘導体に含まれ

14

る。例えば、4-ヒドキシプロリンはプロリンと置換でき、5-ヒドキシリシンはリシンと置換でき、3-メチルヒスチジンはヒスチジンと置換でき、ホモセリンはセリンと置換でき、そしてサルニチンはリシンと置換できる。

【0059】本発明は表1に示される例示的ポリペプチドに限定されるものではなく、むしろ、あるポリペプチドの実質的部分からコクサキ-ウィルス2 (C) のアミノ酸250とアミノ酸273との間の領域、GAD65のアミノ酸250とアミノ酸273との間の領域、又はGAD65のアミノ酸258とアミノ酸281との間の領域からのアミノ酸配列、又はそのセグメント、又はその組み合わせによって特徴付けられるものである限り、そして該ポリペプチドが自己免疫疾患に対して所望の免疫学的又は生物学的活性を示すものである限り、本発明の範囲に入るポリペプチドは上記の領域を越えて伸びるか、或いはこれよりも少ないものからなることができる。更に、本発明のポリペプチドは、そのようなポリペプチドが表1に示すアミノ酸領域から実質的になっており、かつ免疫学的又は生物学的活性を示すものである限り、表1に示すポリペプチドのアミノ酸配列よりも長い、或いは短いアミノ酸配列、又はそのセグメント又はその組み合わせからなるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。更に、本発明のポリペプチドは、表1のGAD65ポリペプチドのアミノ酸配列よりも長い、或いは短いアミノ酸配列、又は該ポリペプチドのセグメントからなるアミノ酸配列で特徴付けられるポリペプチドであって、自己免疫疾患に対する免疫学的又は生物学的活性を示すポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドは全て、自己免疫疾患を刺激したり、或いは増強するものであってはならない。

【0060】従って、本発明のポリペプチドの中からいづれか1個のポリペプチドを特定して選択することは過度の実験を含むものではない。多数のポリペプチドを調製して、自己免疫疾患の改善におけるその免疫学的及び生物学的活性を試験することによって、かかる選択を行うことができる。糖尿病を改善することのできる本発明のポリペプチドをスクリーニングするためには、NODマウスが優秀でかつよく特徴付けられたモデルを提供してくる。

【0061】本発明のポリペプチドは、組み換え法、又は固体支持体上での合成を含む公知のポリペプチド合成法を用いる慣用的合成法によって生産することができる。適当な固相合成法の例は、Merriweather, J. Am. Chem. Soc., 85:2149, 1963) に記載されている。その他のポリペプチド合成法は、例えば、Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d ed., 1976 及び当業者に公知のその他の文献に記載されているポリペプチド合成法の要約は、Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Inc., Ro



15

ckford, III., 1984 に記載されている。例えば, The Proteins, Vol. 11, 3d ed., Neurath et al., eds., 10 S. Academic Press, New York, NY, 1976 に記載されている溶液法によるポリペプチド合成を使用してもよい。このような合成で使用する保護基は、上記の文献に記載されているが、また J. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, NY, 1973 にも記載されている。

【0062】本発明のポリペプチドは所望のポリペプチドをコードするDNA配列で形質転換した適当な宿主中で生産することもできる。例えば、あらかじめ形質転換されており、かつ該ポリペプチドをコードするDNA配列を発現する適当な宿主を発酵させることによってポリペプチドを生産できる。若しくは、本発明のポリペプチドのいくつかをコードするDNA配列を連結し、次いでこれらの配列を用いて自己免疫疾患に関連するポリペプチドを発現するような適当な宿主を形質転換する。

【0063】本発明のGADはポリペプチドの投与量は、自己免疫反応の症状又は細胞破壊が改善されるような所望の効果を生じるのに十分な量である。投与量は、好ましくない交差反応や、アナフィラキシー反応（過敏症）などの副作用を引き起こす極大いものであってはならない。一般に、投与量は年齢、症状、性別、及び患者の病気の重症度によって変化し、当業者によって決定される。万一何れか好ましくない症状があった場合には、投与量は個々の患者により調節される。投与量は、1回の投与当たり、約0.1 mg/m<sup>2</sup> から約2000 mg/m<sup>2</sup> まで、好ましくは約0.1 mg/m<sup>2</sup> から約500 mg/m<sup>2</sup> までで、1日に1回又は数回、1日又は数日間投与する。

【0064】本発明のGADはポリペプチドは、注射又は時間をかけた勾配還流によって経口的に投与される。本発明のGADはポリペプチドは、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、空洞内、又は経皮的に投与される。

【0065】経口的投与のための製剤は、滅菌水性、又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンを含む。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、及びエチルオレエートのような注射可能な有機エステルがある。水性担体は、食塩水及び緩衝液を含む。水、アルコール/水性溶液、エマルジョン、又は懸濁液を含む。経口的担体は、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸化リンガー液、又は固定油(fixed oil)を含む。静脈内担体は、液体及び栄養補充物、電解補充物（リンガーのデキストロースに基づくようなもの）などを含む。保存料、及びその他の添加物、例えば抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなども存在する。

【0066】本発明はまた、本発明のGADはポリペプチドを含む医薬、又は医薬組成物の製造法にも関し、該

16

医薬はGADに対して自己免疫反応の治療に使用される。

【0067】上記の記載は本発明を一般的に述べたものである。以下の特定の実施例を参照することによって、より完全な理解が得られるが、ここで述べる実施例は説明のためのみになされるものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0068】

【実施例】

## 実施例 1

## GADはのクローニング及び発現

## A. 組み換えDNA手法

GADは及びGADはに特異的なcDNAクローンを得るために、Chengwin et al., Biochemistry, 18:5294, 1979の方法を用いて、成熟ラットの脳から、グアニジンイソチオシアネート-セシウムグラジエントによって、全RNAを抽出した。Bethesda Research Laboratories (BRL社) による実験計画者を用いて、ポリ(A) RNAをオリゴdTセルコーストで精製した。ポリd(N<sub>6</sub>)mers (Pharmacia社製) をプライマーとして用いた以外、指示された条件を用いて、MMLV-逆転写酵素(BRL社製)を用いて一本鎖合成を行った。このcDNA-RNA混合物を65℃で15分間加熱して不活性化して、20℃に貯蔵した。PCRのためには、サンプルの1/50を反応物100 µlに加えた。ネコ(cDNAから) (Kobayashi et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987) 及びラット(ペプチドから) (Changand Gotlib, J. Neurosci., 8:2123, 1988) GAD (図1)

の下線を示した共通のアミノ酸配列をコードするために変性(degenerate)オリゴヌクレオチドを合成した(Applied Biosystems)。各変性オリゴヌクレオチドの3'末端配列は、Sst I 及びXba I (5'末端オリゴ) 又はSst I 及びSst II (3'末端オリゴ) のいずれかによって認識されるDNA配列の1本鎖を含む。これらのプライマーを用いて、Gould et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:1934, 1989 に記載されたように、生じたcDNA鋳型のポリメラーゼ鎖反応によって選択的増幅を行った。PCR産物をHind III/Sst I で二重消化されたBluescript SKベクター(Stratagene) にサブクローニングし、DH5 (BRL社製) に形質転換して、標準法(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) によって接種した。

【0069】ネコGADはに特異的な5' <sup>32</sup>P末端標識化オリゴヌクレオチドでコロニーハイブリダイゼーションを行った(Kobayashi et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987)。ニトロセルロースフィルターを50℃で15

(10)

特開平7 70182

17

分画洗浄した以外は、文献 (Wallace et al., in Guide to Molecular Cloning Techniques: Berger et al., Eds. in Methods of Enzymology, Abelson et al., Eds. Academic Press, Inc. San Diego, 432-442, 1987) に記載のようにして、オリゴヌクレオチドの末端標識、ハイブリダイゼーション条件、及び洗浄条件を実施した。ハイブリダイゼーションで陽性及び陰性であったクローンを個々に取り上げて、Terrific液体培地中で一夜成長させた (Tartof et al., Focus, 9:12, 1987)。煮沸法 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) を用いてDNAを単離し、0.2N NaOHで銑型を変性し、Sephacryl S-400 スパンカラム (Pharmacia) で精製した。変性された二本鎖銑型の配列決定は、T7 シークエンスキット (Pharmacia) を用いて、鎖末端法 (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977) によって行った。

【0070】図1に示すように、PCRで生じたラットGAD65及びGAD67 cDNAをプローブとして用いて、標準的手法 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) によって、S. Heinemann (Salk Institute) から供与されたラムダZAP (Stratagene) ラット海馬ライブラリーをスクリーニングした。2400ヌクレオチドのGAD65 cDNA (最大クローン) を単離して、Stratageneに記載するように「ザッピング (zapping)」\* によってサブクローニングした。手元に既にあった3.2 kbのラットGAD67 cDNAクローンよりも小さいラットGAD67 cDNAを得たら、より大きなcDNAの配列決定を行った。GAD65及びGAD67について両方の方向にExon III 削除 (Henikoff, Gene, 28:351, 1984) を行って、銑型を調製し、上記のようにして配列決定を行った。ライブラリースクリーニングにおいて単離された元のcDNAクローン中には現れていなかったGAD65及びGAD67 mRNAの残りの5' 末端をクローニングするために、アンカーPCRを行った (Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998, 1988)。これらのクローンの配列決定を行ったところ、GAD65又はGAD67 mRNAのいずれも、フレーム中に元のcDNAクローンの開始コドンであると以前に固定されたものと共に、更に別の開始コドン (AUG) をなんら含んでいないことが明らかとなった。

#### 【0071】実施例2

##### クローン化GAD65の特徴

A. ノーザンブロットハイブリダイゼーション  
GAD65及びGAD67 cDNAは2個の異なるmRNAに由来するかどうかを決定するために、2個のPCR

18

由来のcDNAプローブを、ラットの脳RNAを含むノーザンブロットにハイブリダイゼーションした。RNAは実施例1に記載したように抽出した。ホルムアルデヒド中の電気泳動によってポリ(A) RNAを分離し、Rotrans (ICN) 膜に移して、100  $\mu$ l/mlのポリ(A)を加えた以外は、Well et al., J. Neurosci., 16:311, 1986 に記載の方法によってハイブリダイゼーションを行った。Feinberg and Vogelstein, Anal. Biochem., 132:6, 1983 に記載のオリゴラベリング法によって、プローブを約10<sup>5</sup> dpm/ $\mu$ gまで標識した。次いでGAD65及びGAD67 cDNAの全長クローンで同じ結果が得られた。

【0072】図1に示すように、レーン1及び2は、ラットの脳から抽出したポリ(A)選択RNA 1  $\mu$ gを含む。レーン1はネコGAD67 (Kobayashi et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987) のラット起源のcDNAプローブとハイブリダイゼーションさせたものであり、レーン2はラットペプチド配列 (GAD65と対応する) のcDNAプローブとハイブリダイゼーションさせたものである。

【0073】ラットペプチド配列のcDNAプローブは5.7 kbのRNAとハイブリダイゼーションし、一方ネコcDNAのラット起源のcDNAプローブは3.7 kbのRNAとハイブリダイゼーションした。これは、GAD65とGAD67が同じmRNAに由来するものではないことを示している。

【0074】B. GAD65及びGAD67のゲノム性ハイブリダイゼーション

GAD65及びGAD67が別々の遺伝子に由来する可能性を調べるために、GAD65及びGAD67の両方のcDNAを、ゲノム性DNAを含むDNAブロットとハイブリダイゼーションした。

【0075】サザンブロットのために、DNAはKaiser et al., in DNA Cloning, vol. 1, A Practical Approach, D.M. Glover ed., IRL Press, Oxford, 38-40, 1985 の記載に従って、ラット肝臓から抽出した。製造者 (BRL, Gaithersburg, MD) の指示する条件を用いて、DNA (10  $\mu$ g/サンプル) をEcoRI及びHindIIIで完全に消化した。0.8%アガロース中、1.5 v/cmで16時間、電気泳動を行ってDNA断片を分離した。次いで、Denhardt溶液の代わりにCarnationドライミルク 3  $\mu$ g/mlを用いた以外は、Gatti et al., Biotechniques, 2:148, 1984 の記載に従って、DNAをZeta-Probe膜 (Bio-Rad) に移して、ハイブリダイゼーションし、洗浄した。サザンブロットのためのプローブは、上記実施例1に記載したように標識した。

【0076】図12に示すように、HindIII及びEcoRIで消化したゲノム性DNAは、それぞれレーン1、3とレーン2、4にある。GAD65 cDNAはレー

(11)

特開平7 70182

19

ン1及び2とハイブリダイゼーションさせ、一方GAD cDNAはレーン3及び4とハイブリダイゼーションさせた。ゲル横にある数字はキロベースで表したDNA断片サイズである。

【0077】このデータは、2個のcDNAは、異なるサイズのゲノム断片とハイブリダイズすることを示している。更に、GAD $\alpha$ とGAD $\beta$ cDNAとの同一のヌクレオチド配列のうち最大の連続した配列は、たった17ヌクレオチド塩基の長さである。従って、GAD $\alpha$ とGAD $\beta$ とは2個の異なる遺伝子によってコードされている。

【0078】C. GAD $\alpha$ 及びGAD $\beta$ の酵素的比較 GAD $\alpha$ 及びGAD $\beta$ の活性におけるPLPの効果と比較する研究を行った。そのためには、両方のcDNAをバクテリア中でその発現ができるようなベクター中にサブクローニングした(Studier et al., J. Mol. Biol., 189:113, 1986)。GAD $\alpha$ cDNAをpET-8ベクターのNcoI部位にサブクローニングし、かつGAD $\beta$ cDNAをpET-5ベクターのNheI部位にサブクローニングすることによって、融合しない(fusionless) GAD $\alpha$ 及びGAD $\beta$ の過発現を実施した(Studier et al., J. Mol. Biol., 189:113, 1986)。

【0079】両方のcDNAを正しいフレーム内でサブクローニングするための両立性の付着末端を得るために、United States Biochemical (USB)の指示する条件を用いて、混合物中における200  $\mu$ M dNTPと1.5mM MgCl<sub>2</sub>で、PCRによる塩基的増幅を行い、AmpliTaq (USB)の不確実さを減少するために55°C、20サイクルでアニーリングした。GAD $\alpha$ 及びGAD $\beta$ に特異的なプライマーは、それぞれNcoI及びSpeI制限酵素切断部位の1本のDNA鎖を含んでいた。GAD $\alpha$ のコーディング領域にはNheI切断部位があるので、SpeI (NheIと両立性)を用いた。

【0080】PCR産物をそれぞれのpETベクターにサブクローニングし、DH5に形質転換して、上記のよ

20

うに接種した(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1995)。コロニーを取り出して、アンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB液体培地中で一夜成育させた。正しい方向性を有するサブクローンを過発現のためにBL21 (DE3)株(Studier et al., J. Mol. Biol., 189:113, 1986)に形質転換した。ネガティブコントロールとして、挿入物をもたないpET-8ベクターを形質転換して、誘導した。1個のコロニーを取り出して、成育し、1mMのイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトース(1PTG)で誘導して、文献(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)に記載のようにSDS-PAGEゲル上で分析した。

【0081】GAD活性を測定するために、OD<sub>550</sub>の5のバクテリア培養物10mlを1PTG 1mMで誘導した。誘導後2時間で、バクテリアを遠心して、ホモジナイズ用バッファー(1mMブツ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、1mM 臭化2-アミノエチルイソチオウロニウム(AET)、及び60mMリン酸カリウム、pH7.1)1ml中に再懸濁して、超音波処理した。超音波処理後、細胞カスを遠心で除去し、上清(少量の血清を-70°Cで貯蔵した)中のタンパク質濃度を測定した(Bradford, Anal. Biochem., 72:248, 1986)。文献(Legay et al., J. Neurochem., 46:1478, 1986)に記載のように脳ホモジネートを調製した。Kriegler et al., J. Neurochem., 33:299, 1984の記載に従って、0.2mM PLPの存在下、又は不存在下、インキュベーション混合物中に脳ホモジネート又はバクテリア培養物20  $\mu$ lを入れて、GAD活性を測定した。バクテリア培養物中の<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>の生産量は、インキュベーション時間及びタンパク質濃度に比例していた。

【0082】

【表2】

試料	GAD特異的活性 <sup>a</sup>		誘導による 増加倍率
	-PLP	+PLP	
BL21 (DE3) + pET-3c	12 $\pm$ 0.4	9 $\pm$ 1	—
BL21 (DE3) + pET-GAD $\alpha$	115 $\pm$ 3	778 $\pm$ 81	8.7
BL21 (DE3) + pET-GAD $\beta$	160 $\pm$ 2	389 $\pm$ 8	2.4
ラット脳	131 $\pm$ 5	216 $\pm$ 2	1.6

a: 三重試験の<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> /  $\mu$ gタンパク質/時間のcpm  $\pm$  S. E. M.

表2に示すように、GAD $\alpha$ 又はGAD $\beta$ を含むバクテリア培養物は、<sup>14</sup>C-グルタミン酸と、GABA及び<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>との変換を触媒する。

【0083】PLPは、GAD $\alpha$ よりもGAD $\beta$ の酵素活性を刺激する。この10倍の刺激は多分、Murphy及びその共同研究者(Marlin, Cell. Mol. Neurobio

(12)

特開平7-70182

21

1. 1:237, 1989) が提唱した不活性サイクルを通して、GAD65がより速く循環することを示している。このより速い循環は、in vivoで存在するapoprotein GADのプールに、GAD65がより貢献していることを示している(Miller et al., Brain Res. Bull., 5(Suppl. 2) 89, 1980)。従って、in vivoではP.L.P.は、GAD65活性よりもGAD67活性をより抑制していると考えられる。

【0084】バクテリア溶菌物中のGAD65活性は、ラット黒質から調製したシナプトソーム中に見られるGAD活性の5倍のP.L.P.刺激にはほぼ等しい(Miller et al., J. Neurochem., 33 533, 1979)。いすのGAD65も、粗ラット脳ホモジネート中のGAD活性よりもバクテリア中に加えたP.L.P.により依存するので、バクテリア溶菌物の内在P.L.P.濃度は、ラット脳ホモジネートよりも少ないかも知れない。

【0085】D. GAD65及びGAD67の免疫学的同定  
上記のようにしてラット脳ホモジネートとバクテリア溶菌物を抽出した(Harlow et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988)に記載されたように、各サンプルに等量の電気泳動用バッファーを加えた。SDS中の10%アクリルアミドゲルで電気泳動を行って、タンパク質を分離し、電気泳動的にニトロセルロースに移した(Harlow et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988)。未反応部分を、2%ウシ血清アルブミン(フラクションV)、1%ゼラチン、及び1%トリトン-X-100を含むリン酸バッファー溶液(PBS)を用いて、4℃で、1時間ブロックした。洗浄後、ニトロセルロースフィルターを3つの部分に切断し、以下の一次抗体と共にインキュベーションした。レーン1から4は、GAD65及びGAD67の両方を認識するOertel et al., Neuroscience, 6:2689, 1981の抗血清の1/2000希釈と共に；レーン5から8は、GAD65のみを認識するK-2抗血清の1/2000希釈と共に；レーン9から12は、GAD65に特異的なGAD-6モノクローナル抗体(Chang et al., J. Neurosci., 8 2123, 1988)の1/2000希釈と共にインキュベーションした。全てのフィルターをよく洗浄して、適当な二次抗体をインキュベーションして、洗浄した。結合した抗体は、<sup>125</sup>I-標識タンパク質A及びオートラジオグラフィーにより検出した。各レーンは以下のものを含んでいた：レーン1、5及び9は、BL21(DE3)+pET-GAD65；レーン2、6及び10は、BL21(DE3)+pET-GAD67；レーン3、7及び11は、ラット脳ホモジネート；そしてレーン4、8及び12は、BL21(DE3)+pET-8c。

【0086】バクテリア産出性のGAD65及びGAD67のイムノプロットは、GAD65が脳抽出物の小さいG

22

ADとよく対応し、そしてGAD67は大きい形とよく対応することを示している(図13)。これまでの研究は、GAD65がネオGAD65及びマウスGAD65に比べての大きいGADと対応することを示している(Kalarcova et al., Eur. J. Neurosci., 2:190, 1990; 235, 1989)。バクテリア産出性のGAD65及びGAD67の可動性(Oertel et al., Neuroscience, 6:2689, 1981)の抗血清で検出した場合(は、ラット脳ホモジネートに見られる免疫反応ダブルット(immunoreactive doublet)と同じである。

【0087】ラット脳中のGADの低分子重量及び高分子重量形は、それぞれGAD65及びGAD67 cDNAの産物と、抗原的にまた大域的に同じものである。その結果、ラット脳中の2つのGADは、GAD65とGAD67である。このデータから、既に報告されているクビア(Tapia)によるP.L.P.-依存性GADと、P.L.P.-非依存性GAD(Bayon et al., J. Neurochem., 29:519, 1977)は、それぞれGAD65及びGAD67と分子的に同じものである、と結論付けることができる。Mancini及びその共同研究者(Spink et al., Brain Res., 421:235, 1987)は、ラット脳GADには4つの運動力学的に異なる形が存在することを報告している。しかしながら、これらの形のイムノプロットング(ここで用いたような抗血清を用いる)については報告されていない。

【0088】E. 脳組織中のRNAにおけるGAD65及びGAD67の分布

その場での(in situ)ハイブリダイゼーションを用いて、小脳のRNAにおけるGAD65及びGAD67の分布を決定するための実験を行った。

【0089】GAD65及びGAD67 cDNAからの、それぞれ3.2 kb及び2.3 kbの転写物を、Wuensche et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83 6193, 1986の方法に従って、<sup>32</sup>Pで放射性標識した。200 bpの加水分解断片を、ラット小脳の冠状セクションとハイブリダイズさせた。動物はハロタンで麻酔して断首した。脳をドライアイス中で急速に冷凍して、冠状凍結セクション(12 µm)を、新たに調製したリン酸緩衝液(PBS: 130 mM NaCl, 10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0)中の4%ホルムアルデヒド中で、30分間固定した。組織を勾配化エタノール溶液中で脱水し、-70℃で貯蔵した。

【0090】組織の透過性を増加するために、セクションを以下の前処理に付した：勾配化エタノール溶液(95%, 85%, 70%, 60%及び30%エタノール中に各5分)中での再水和；PBS(5分)；0.002 N HCl(10分)；PBS(5分)；PBS中の0.01%トリトンN-101(1分)；PBS(2 x 5分)；1 µg/mlプロテイナーゼK(7.5分)；及びPBS中のグリシン(プロテイナーゼKを阻害するた

(13)

特開平7 70182

23

め) (3 x 5分)。プロテアーゼKは使用前に37℃で30分間消化した。次いでセクションを37℃、5.0%ホルムアミド、7.50mM NaCl、2.5mM EDTA、0.02% SDS、0.02% BSA、0.02% ツイコール(Sicot)、0.02% ポリビニルピリドン、2.50μg/ml イースト tRNA、2.50μg/ml ホリA、及び2.5mMPPES (pH 6.8) 中でインキュベーションした。

【0091】ハイブリダイゼーションのためには、1.00mM DTT、1.0% 硫酸デキストラン、及びセンス(sense)又はアンチセンス(antisense)の<sup>32</sup>S-RNAを、ハイブリダイゼーション溶液に加えた。プローブ(センス又はアンチセンス)約3ng (100cpm)を含むハイブリダイゼーション溶液の少量(50μl)をスライド上に加えた。各スライドのカバーをして、50℃で16時間インキュベーションし、次いでシリコン処理したカバーを1xSSC (1xSSC: 150mM NaCl、60mM クエン酸ナトリウム、pH7.0)で短時間洗浄した。

【0092】次いでセクションをリボマクレーアゼA (0.5M NaCl、1.0mM テオ硫酸ナトリウム、1mM EDTA、1.0mM TrisHCl、pH8.0中、5.0μg/ml)で、37℃、20分間処

24

\*理して、2xSSC中、室温で2時間リンスし、1.0mM テオ硫酸ナトリウム中、55℃で30分間リンスした。セクションをエタノール中で脱水し、キシレン中で脱脂して、Kodak NTB2エマルジョンでコーティングし、4℃で10日間露光した。エマルジョンをKodak D19で現像して、組織をクレッセルバイオレットで対比染色した。

【0093】反射偏光を用いてオートラジオグラフ粒子を検出し、粒子数、密度、and細胞領域をAnalytic Imaging Conceptsイメシアライザースystemで測定した。バックグラウンドレベルが低いために、細胞が"標識された"と定義するための基準を、5以上の集団化した粒子の存在において、GAD標識された細胞が脳中に分散して見受けられ、個々の細胞上の粒子数の測定を可能とした。細胞と、粒子によって覆われた領域との境界によって、1細胞当たりの領域数の計算が可能となった。染色された細胞と、上におかれた粒子とを同時に見ることで、反射偏光と透過光との両方を用いて、高倍率(800x)で分析を行った。数は、"n"細胞の平均±S.E.M.である。

【0094】

【表3】

表3

粒子/細胞

細胞タイプ	GAD <sub>67</sub> mRNA	GAD <sub>65</sub> mRNA	GAD <sub>67</sub> :GAD <sub>65</sub>
ブルキニエ	172±34 (87) <sup>a</sup>	43±2 (70)	4.0
ゴルジ	96±8 (80)	64±9 (65)	1.5
細胞	61±12 (102)	16±1 (57)	3.8
星	55±15 (65)	18±3 (37)	3.1

a: ±S.E.M. (n)

全ての神経性細胞タイプにおいて、GAD<sub>67</sub>mRNAレベルの方が大きい。in situでのハイブリダイゼーションにおける観察は、小脳中の非依存性GAD活性に対するPLPの依存率は、試験した脳領域中で最も低いものの一つである、という従来の知見(Nitsch, J. Neurochem., 34:822, 1980; Denner et al., J. Neurochem., 44:957, 1985; Iton et al., Neurochem. Res., 6:1283, 1981)と一致している。更に、表3に示すように、GAD<sub>67</sub>mRNAに対する量は、ブルキニエ>ゴルジ>細胞>星細胞の順であり、一方GAD<sub>65</sub>に対する量は、ゴルジ>ブルキニエ>細胞>星細胞の順である。

【0095】このようにGAD<sub>67</sub>及びGAD<sub>65</sub>mRNAの発現はニューロンのクラスによって異なる。つまり、全GADに対するそれぞれの貢献度は、いかにGABA生産が制御されているかに影響している。例えば、黒質は、PLP-非依存性GAD活性に対して、最も高いP

LP-依存率の一つを含む(Nitsch, L. Neurochem., 34:822, 1980)。GABA酸化作用の阻害剤を局部的に注射することによって、黒質におけるGABA濃度を増加させることは、痙攣感受性(seizuresusceptibility)の減少に特に有効である(Gale, Fed. Proc., 44:2414, 1965)。従って、PLP-アンタゴニストによって誘導される捕獲を受ける実験動物は、特に黒質内の神経末端におけるGAD<sub>67</sub>の阻害のために、捕獲の伝達を阻害することができない。

【0096】F. GAD<sub>67</sub>及びGAD<sub>65</sub>の無細胞系配置GAD<sub>67</sub>及びGAD<sub>65</sub>の分布をS<sub>1</sub>及びシナプトソーム無細胞分画において評価した。S<sub>1</sub>は、脳中の全細胞の細胞質溶からなる高速上清であり、一方シナプトソーム分画は、主として神経終末からなる(Gray et al., J. Anat., Lond., 96:79, 1962)。これらの研究のために、50は、全ラット脳分画を、Booth and Clark, Biochem. J.,

25

176-365, 1978) の記載するように行った。タンパク質濃度をSchallner and Weissman (Schallner et al., *Anal. Biochem.* 56:502, 1973) の方法によって測定した。Kaiser et al., *DNA Cloning*, Vol. 1, A Practical Approach, D.M. Glover ed., IRL Press, Oxford, 1985, pp. 38-40 に記載の方法でサンプルを調製し、GAD<sub>65</sub>モノクローナル抗体及びK-2抗血清を用いて上記のようにしてイムノブロッティングを行った。等量のタンパク質 (1.6 µg) を各レーンに加えた。オートラジオグラフィは、1, 3, 10, 30, 100 µgのタンパク質濃度で、K-2抗血清及びGAD<sub>65</sub>モノクローナル抗体の両方と抗体結合した<sup>125</sup>I-タンパク質Aの量が線状に増加する応答を示している (データ示さず)。

【0097】この結果は、どちらの分画にも等量のGAD<sub>65</sub>が存在することを示している。S<sub>1</sub>分画は神経膠 (及びその他の非ニューロン性) の細胞質タンパク質と、ニューロン細胞とを含んでいるので、GAD<sub>65</sub>の濃度は、神経末梢よりもニューロン細胞体部における方が大きいに違いない。これとは対照的に、GAD<sub>65</sub>の濃度はS<sub>2</sub>よりもミトコンドリアにおける方が大きい。これらの無細胞分画実験は、GAD<sub>65</sub>とは対照的に、神経末梢よりもニューロンの細胞体部において、はるかに大きいGAD<sub>67</sub>分画が存在することを示唆している。従って、免疫組織化学的研究におけるのと同様に、無細胞分画化は、GAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>が異なる無細胞分画を有していることを示している。

【0098】GABAの合成及び分解阻害剤を用いる *in vivo* の実験において、ニューロン細胞体部におけるGABAプールは、神経末梢におけるGABAプールとは異なることを示唆している (Iadarola et al., *Mol. Cell. Biochem.* 39:305, 1981)。GAD<sub>65</sub>によって生産されるGABAは細胞代謝において (例えばGABAシャント (shunt) において)、そして神経細胞樹状突起シナプスにおいて、より保われている。樹状突起と末に神経細胞樹状突起シナプスを形成し (Shepard, *Physiol. Rev.* 52:864, 1972)、そして多分GABAを放出している (McLennan, *Brain Res.* 29:117-184, 1971) 嗅神経球にある顆粒細胞の樹状突起は、K-2抗血清で強く標識する。ここに示していないが、嗅神経球においてはGAD<sub>65</sub>よりもGAD<sub>67</sub>mRNAレベルの方が大きい (2-3倍) ことが見いだされている。この分布は、嗅神経球におけるGAD活性のほとんどがシナプトソームにではなく、S<sub>1</sub>及びP<sub>1</sub> (粗核ペレット) に存在する、という知見 (Quinnet al., *Neurochem.* 35:583, 1980) と一致している。

【0099】GAD<sub>65</sub>とGAD<sub>67</sub>の無細胞分布の相違は、細胞体質の係留性 (cytoskeletal anchoring) 又は未知のタンパク質標的機構によるものかも知れない。また、一部の細胞体質タンパク質は、GAD<sub>65</sub>とGAD<sub>67</sub>で似た分布を有している。例え

14.

26

特開平7 70182

ば、培養交感神経細胞において、Peng et al., *J. Cell. Biol.* 102:252, 1986は、タウ (tau) の84%は軸索に存在するが、一方MAP-2の100%が細胞体及び樹状突起に存在することを示した。更に、細胞体質タンパク質である、43 kDのタンパク質が、アセチルコリンレセプターをその下にある膜細胞体質に係留するためのものである、と考えられている (Flucher et al., *Neuron* 3:163, 1989)。

#### 【0100】実施例3

#### 40 臨床標本中のGAD自己抗体の検出

##### A. 材料及び方法

1. 患者標本: Atkinson及びその共同研究者 (Atkinson et al., *Lancet* 335:1357-1360, 1990) の以前の研究から、4グループの患者の血清を選抜した。このグループは以下のものからなる。グループ (1) 以前はUniversity of Florida, Diabetes Clinicsと呼ばれていた権威あるNational Diabetes Data Group (NDDG) の基準 (Gleichman et al., *Diabetes* 36:578-584, 1987) に従って診断された、1人の新規発病IDD患者; グループ (2) 家族に自己免疫疾患の病歴をなんら持たない、5人の無作為に選抜された小島細胞細胞質抗体 (islet cell cytoplasmic antibody: ICA) 陰性の非-糖尿病性コントロール; グループ (3) IDDの発病が記録される前の3から6ヵ月間、血清が収集されてきた13人; グループ (4) 非-糖尿病性コントロール及び親族、及びIDD発病前に研究された人達; 及びグループ (5) IDDMの危険があるが、まだ発病には至っていない3人の患者。この後者のグループは、IDD発病者 (proband) の第1級親族5000人以上、及び一般人8200人 (このうち4813人が学童である) の継続的ICAスクリーニングによって確認した。

【0101】2. 小島細胞自己抗体: 血液型Oのクリオカット (cryocut) 肺炎を間接免疫蛍光法でICAアッセイした (Atkinson et al., *Lancet* 335:1357-1360, 1990)。全ての結果をコードしたサンプルで、各バッチにおける陰性及び陽性コントロール血清と比較しつつ解釈した。ICA陽性の程度はICA標準化 (Gleichman et al., *Diabetes* 36:578-584, 1987) のためのImmunology Diabetes Workshop (IDW) によって確立されたガイドラインに沿って分析した。全ての陽性な血清を端点希釈によって滴定し、あらかじめ80ユニットの国際若年糖尿病協会 (Juvenile Diabetes Foundation: JDF) 標準に調整しておいた標準血清との比較によって、JDFユニットを測定した。ここで報告する研究においては、陽性なICA結果とは10 JDFユニット又はそれ以上の血清希釈で定義される。

【0102】3. HLA-DRタイピング: DRトレ

27

イ (One Lambda Laboratories, Los Angeles 社製, CA) を用いて, Van Rod and Van Leuven, Nature, 252:195-197, 1976 に記載の方法で HLA-DR タイピングを実施した。

【0103】4. ヒト小島細胞: ヒト膵臓小島をカダベリン性 (cadaveric) 膵炎から単離し、下記したように (Ricoedi et al., Diabetes, 37:413-420, 1988) in vitro で維持した。小島細胞を in vitro で (95% 空気 / 5% CO<sub>2</sub>) <sup>35</sup>S-メチオニン (Amersham, Arlington Heights, IL) で代謝的に標識した。

【0104】5. 小島細胞の抽出及び免疫沈降: Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990 に記載の方法で、以下の修飾を用いて小島細胞を抽出した。免疫沈降の研究のためには、小島細胞溶解物を、各 1000 小島細胞毎にコントロール、IDD 血清 (100 µl)、又は GAD-6 (Chang et al., J. Neuro., 8:2123-2130, 1988) (トリスバッファー 9.9 µl 中に 1 µl) (Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990) のいずれかと共にインキュベーションする (2 時間、4°C) ことによって、2 度前処理した。次いで免疫複合体を、過剰のタンパク質 A セファロース CL-4B (Pharmacia, NJ) に吸着させた。次いで、非結合性 (前処理した) 溶解物を含む 1000 個の小島細胞を含む少量を、IDD 又はコントロール血清 (2.5 µl)、又は GAD-6 (Chang et al., J. Neuro., 8:2123-2130, 1988) (トリスバッファー 9.9 µl 中に 1 µl) でインキュベーションした。タンパク質 A セファロース CL-4B でもう一度インキュベーションした (1 時間、4°C) 後、複合体を 0.1% SDS、1.0% トリトン X-114、及び 2 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸 (pH 7.4) で 5 回洗浄し、次いで 2 重蒸留水で 1 回洗浄した。タンパク質 A セファロース CL-4B を次いで Laemmli サンプルバッファー (Laemmli, Nature, 227:680-685, 1970) 中で煮沸し、そのサンプルを SDS-PAGE 及び Enhance (New England Nuclear 社製) を用いる蛍光ラジオグラフィ (Kodak 社製, X-oma1 AR 5) に付した。或いは、オートラジオグラフを BETA GEN (Boston 社製, MA) アナライザーによって分析した。6.4 kA の陽性又は陰性の血清を各アッセイで用いて、アッセイ内コントロールとした。全ての蛍光ラジオグラフィを分析して、既知のアッセイ内コン

115:

特開平 7 70182

28

ロールと比較して陽性又は陰性と区分けした。陽性な血清サンプルは、もしもサンプルが 6.4, 0.0 DM、バンドの低い強度の免疫沈降であったなら、これを 1 とし、もしも中程度の強度のバンドが観察されたら 2 とし、そしてもしも免疫沈降タンパク質の強度が大きければ、これを 3 とした。免疫沈降した <sup>35</sup>S-GAD<sub>66</sub> 及び (<sup>35</sup>S-GAD<sub>66</sub>) に対応するバンドの強度についても同様の区分けを用いた。

【0105】6. 免疫沈降: <sup>35</sup>S-GAD<sub>66</sub> 又は <sup>35</sup>S-GAD<sub>67</sub>、及びヒト脳ホモジネートからの GAD を含むバクテリア溶解物の免疫沈降を、上記のヒト小島細胞抽出物の免疫沈降研究で記載したのと同様に行った。

【0106】7. GAD アッセイ: ヒト脳ホモジネートを、上記のヒト小島細胞で記載したように、患者血清と共にインキュベーションした。吸着及び洗浄後、タンパク質 A アガローススラリーの少量を 3 回、等量で採取し、GAD 活性を Krieger et al., Neurochem. 33:299, 1984 に記載のように測定した。簡単に言うと、タンパク質 A アガロースビーズを (1 µl) グルタミン酸 (Amersham) と共に、指定のインキュベーション混合物 (Krieger et al., Neurochem. 33:299, 1984) 中でインキュベーションし、液体シンチレーションカウンターで (100%) の生産を定量化した。

【0107】8. <sup>35</sup>S-GAD<sub>66</sub> 及び <sup>35</sup>S-GAD<sub>67</sub> の生産: ラット GAD<sub>65</sub> 及び GAD<sub>67</sub> cDNA を上記したようにバクテリア発現系にサブクローンした。<sup>35</sup>S-GAD の標識は、IPTG 誘導性バクテリア (最小培地で成育) を TRANS ラベル (ICN) で 15 分間パルスすることによって行った。次いで培養物を遠心して、ホモジナイズバッファー (1 mM フェニルメチル sulfonyl フロリド (PMSF), 1 mM 2-アミノエチルイソオウロニウムブロミド (AET) 及び 60 mM リン酸カリウム, pH 7.1) 中に再懸濁して、超音波処理した。超音波処理の後、遠心によって細胞カスを除去し、上清 (上清は -70°C で少量貯蔵した) 中のタンパク質濃度を測定した (Bradford, Anal. Biochem., 72:248, 1986)。

【0108】B. IDD 標本の免疫反応性

IDD を有する患者からの血清を用いて、ヒト脳ホモジネートからの GAD を沈降させる能力を試験した。

【0109】

【表 4】

15:

特開平7 70182

29

30

表4

## 1DDM患者からの血清の免疫沈降GAD活性

患者	1DDM	1DDM前の期間 <sup>1</sup>	64K <sup>2</sup>	IDF <sup>3</sup>	GAD活性 <sup>4</sup> (cpm/s)
DA	*	>24	3	164	13,762
DC	*	>1	3	20	1,719
RS	+	5	3	40	588
NL	+	0	2	80	440
DM	*	>1	2	10	184
C	-	na	0	0	280
C	-	na	0	0	285
C	-	na	0	0	325
C	-	na	0	0	275
C	-	na	0	0	270

1:月で表示

2:実験法の部で記載した64K力価

3: Juvenile Diabetes Foundation (JDF) ユニットで表した小島細胞免疫試験

4:バックグラウンドに調整せず

5:糖尿病の危険あり(グルコース試験せず)

na:適用できず

表4に示すように、1DDMの危険があるか、或いは1DDM患者の(5例のうち)4例の血清は、コントロール患者の血清よりも、有意に大量のヒト脳抽出物の酵素的に活性なGADと結合している。更に、患者のうちの1人からの血清は前1DDM時期に採取されており、従ってGADに対する自己抗体は1DDM症状の発病前に存在していたことになる(下記のC参照)。

【0110】更に別の実験(結果を示さず)では、1DDMの危険がある患者2人(DA, DC)からの血清は、組み換え法で生産された<sup>35</sup>S-GAD<sub>63</sub>を免疫沈降させるが、一方組み換え法で生産された<sup>35</sup>S-GAD<sub>65</sub>は、患者DAの血清のみによって認識された(そしてこれは<sup>35</sup>S-GAD<sub>63</sub>よりも弱い)ことを示した。またそれ以後の研究で、神経病の合併症を有する1DDM患者の血清中には、GAD<sub>63</sub>よりもGAD<sub>65</sub>自己抗体の力価が大きいことが見いだされた(ここでは示さず)。

【0111】患者DAの血清を用いる別の研究において、ヒト膵臓小島細胞で生産される特異的ポリペプチドを認識する抗体の存在が示された。結合ポリペプチドの

電気泳動分析によって、他の研究者によって以前にヒト1DDM(Baekkeskov et al., Nature, 298:167-169, 1982)及び動物モデル(Baekkeskov et al., Science, 224:1348-1350, 1984; Alkinson et al., Diabetes, 37:1587-1590, 1988)で示されたような、64kDの成分に対する自己抗体の存在が明らかとなった。GAD<sub>63</sub>を認識するが、GAD<sub>65</sub>は認識しない、GAD-63モノクローナルで、或いはバクテリアで生産されるGAD<sub>63</sub>でこれらの血清をあらかじめ吸着させると、64kDの肺炎ポリペプチドを血清が認識する能力が失われる。従って64kDの自己抗原に対する自己抗体によって認識されるエピトープがGAD<sub>63</sub>中に存在し、このことは該自己抗原がGAD<sub>63</sub>であることを示唆している。GAD<sub>63</sub>の予測される価値を研究するために、1DDMの臨床的発現の発病前の患者から血清を採取して、このGAD<sub>63</sub>に対する自己抗体を調べた。

【0112】

【表5】



31

特開平7 70182

32

## 表5

## 1DDM患者における発症発病前の自己抗体の分析

患者	性別	HLA	発病時の年齢 <sup>1</sup>	1DDM発病との期間 <sup>2</sup>	1DF	64KA <sup>3</sup>	GAD <sub>65</sub> <sup>3</sup>	GAD <sub>67</sub> <sup>3</sup>
TA	M	3, 2	17	11	20	2	0	1
CA	F	4, 5	38	4	0	1	1	0
RA	M	2, 1	5	34	0	2	1	0
TB	M	2, 4	11	66	40	1	1	0
AB	M	N. D.	23	6	160	3	3	2
VC	F	4, 6	15	3	40	1	C	1
JD	M	6, 1	34	25	10	3	1	1
DR	F	3, 4	14	42	820	2	1	0
JG	M	3, 3	12	8	40	1	0	0
BR	M	3, 3	5	9	0	0	1	1
KR	F	4, X	34	14	10	3	2	0
JT	F	4, 6	7	10	N. D.	1	1	1

1: 1DDM発病年齢を月で表示

N. D.: 測定せず

2: 血清採取と1DDM発病との間隔を月で表示

3: 1-弱い; 2-中程度; 3-強いバンド強度

表5に示すように、12標本中の9標本(75%)はS-GAD<sub>65</sub>と免疫反応性であった。更に、2人の患者(VA及びVC)はこの条件下でGAD<sub>65</sub>と免疫反応性であったが、GAD<sub>67</sub>とは免疫反応性でなかった。従って、組み合わせると、これらの患者の血清の12例中、11例(91%)にGAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>に対する自己抗体が存在した。このことは、GAD<sub>65</sub>に対する自己抗体はGAD<sub>67</sub>に対する自己抗体よりも一般的であるが、アッセイにおいて両方の組み換えGAD(GAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>)を用いると、1DDMをより広く予測できるようになることを示唆している。これらの血清についての以前の試験(Atkinson et al., *Lancet*, 335:1351-1356, 1990)は、12例のうちの11例、又は92%がヒト脾臓小島細胞からの<sup>35</sup>S-64kD分子と免疫反応性であることを示している。64kD分子に対する検出可能な自己抗体を含むが、GAD<sub>65</sub>に対する自己抗体は含まない血清は、64kD分子にとって最低の価(又は"1")を含む血清であった。従って、ここで得られた誤りの陰性はこのアッセイの感度が低いために起きたことである。更に、このアッセイは、64Kに対して陰性な1人の患者(BR)に1DDMを予測している。

【0113】これらの結果は、ヒト脾臓のβ細胞中に固定された64kDは、ラットGAD<sub>65</sub>とサイズ及び抗原性が同一であることを示している。更に、1DDM発

病前の患者から採取した血清は、GAD<sub>65</sub>に対する自己抗体を含んでいる。結論として、GAD<sub>65</sub>組み換え分子は、1DDM予測の診断手段として非常に有用である。実際に症状がでる前に医師が1DDMを診断できるということは、疑いもなくインシュリン治療が必要となるまでの時間がおおいに伸びる結果となる。このような免疫アッセイの感度は、脾臓のβ細胞に存在するGAD形を表すヒト由来の組み換えGAD<sub>65</sub>を用いて改良されるであろう。

## 【0114】実施例4

## ポリペプチドへの免疫増殖応答

自動合成機(Applied Biosystems社製)と標準条件とを用いてポリペプチドを合成した。次いでこれらのポリペプチドの、脾臓リンパ球及び小島細胞性Tリンパ球(IITL)の増殖を刺激する相対的能力を比較するために、これらのポリペプチドを試験した。この研究においては、GAD<sub>65</sub>コア配列に由来するポリペプチドと、ポリオウィルスの相関領域に由来するポリペプチドとを比較した。適当な細胞をそれぞれのポリペプチドと共に5日間、 $5 \times 10^4$ の照射脾臓細胞の存在下に培養した。培養の最後の16時間に<sup>3</sup>H-チミンを加えた。

## 【0115】

## 【表6】

(18)

特開平 7 7 0 1 8 2

33

34

## 表 6

リンパ球集団による

<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み (cpd)

抗原	アミノ酸配列	小島 <sup>a</sup>	大島 <sup>b</sup>
なし	-	1. 100	6. 500
ポリオウィルス	MSMCPQAQLKVKYL	900	22. 500
GAD <sub>65</sub>	AAFKMPPEYKKEKMA	9. 500	23. 300

a: 小島免疫性Tリンパ球 (3 x 10<sup>4</sup> 細胞/ウェル)b: 1 x 10<sup>5</sup> 細胞/ウェル

これらの研究において、脾臓リンパ球の培養物の増殖活性においては、ポリオウィルス又はGAD<sub>65</sub>ポリペプチドのいずれと接触させたものにも有意の差は見られなかった。しかしながら、いずれのポリペプチドも、コントロール培地に見られた応答よりも高いT細胞応答を刺激した。脾臓細胞集団における差異がないことは、T細胞に特異的なGADポリペプチドの頻度が低いことによるものかも知れない。

【0116】同様の方法で評価したときの11T1集団は、細胞増殖において顕著な差異を示した。このシステムにおいては、GAD<sub>65</sub>ポリペプチドに対する応答は、培地又はポリオウィルスポリペプチドのいずれの応答よりも9倍大きかった。このデータはGAD<sub>65</sub>が11T1集団におけるT細胞応答のための重要な抗原であることを強く示唆している。このデータは糖尿病の病原学において分子擬態 (mimicry) が一定の役割を果たしていることを示唆している。

【0117】今や本発明は十分に説明されたので、当業界で通常の知識をもった人には、本発明の範囲を逸脱することなく、多くの変更や修飾が可能であることが明らかであろう。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 GAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>特異的cDNAプローブを得るためのクローニング計画を示す図である。

【図2】 ラットGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。(図3に続く)

【図3】 ラットGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。(図4に続く)

【図4】 ラットGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。

【図5】 ヒトGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。(図6に続く)

【図6】 ヒトGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。(図7に続く)

【図7】 ヒトGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。(図8に続く)

【図8】 ヒトGAD<sub>65</sub>のDNA配列及び対応するアミ

ノ酸配列を示す図である。

【図9】 ラットGAD<sub>65</sub>とヒトGAD<sub>65</sub>アミノ酸配列の

比較を示す図である。(図10に続く)

【図10】 ラットGAD<sub>65</sub>とヒトGAD<sub>65</sub>アミノ酸配列

の比較を示す図である。

【図11】 GAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>cDNAの異なるサイ

ズのRNAへのハイブリダイズを示す図である。

【図12】 GAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>に特異的なcDNAプ

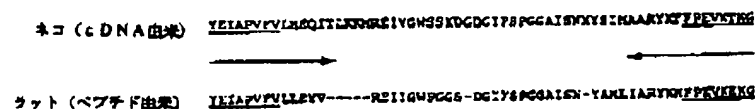
ローブでハイブリダイズしたサザンブロットを示す図で

ある。

【図13】 GAD<sub>65</sub>及びGAD<sub>67</sub>の免疫学的同定を示す

図である。

## 【図1】



193

特開平 7 - 7 0 1 8 2

[ 2 ]

( 10 )

＜【國語】に於て＞

```

GCGCGTGGCGGTGGAGCGCGAGCGATTGCGCGAGCGCACTCGGATGGCGAGCGCGCA 101
      10      30      50
GACTAGCAGAACCCCATGGCATGTGCGGGGTCTGCTTCTTCTGCTGAGATCGAAGT 101
      70      80      110
GCGCGPPENFGTARAWCGQVAAQK 151
GCTCTGCGGCTCTCGAGAACCGCGGAACGACGAGAGGCTGTGCGCGAGGTGGCGCGAAAGT 151
      130      160      170
TCGCGCGCGCATCGGAACCAAGCTATCGCGCTCTCTCTACGAGAGCTCTGAGACCGA 201
      190      210      230
ISGCGSVTSZAAATARKVACCTCTGACCTTC 2501
CAGAGAGCGCGCGGAGCGGTGACCTCGCGCGCGCACTCGCGAGAGTCTGCGCTGCTTTC 251
      220      270      290
QKFKCSGCPKCGDUNHYALCHRTAD 351
ACCAAAACCTCGAGCTCGCGCAACGAGATGTCAATATGACCTCTCGCGCGCAAGCG 351
      310      330      350
LZLZAGCGCTTGAAGAGAGAAAGCGCGCACTCTCGCATTCCTGAAAGCTATATGA 401
      370      390      410
LQLQYVVKSFDRSKVVDPFH 451
ACATCTGCTTCAGTACCTGTGGAAGCTTTGATACATCACTAAAGTCACTGATCTTC 451
      430      460      470
YFMKELQEYHNKSLADAGPQNH 501
ATTACCGAATCGAGCTTCTCAAGATATATATGGGAATTGCGAGCAACCGCAAAATC 501
      490      520      530
EKLTLTGACGCACTGCGAAACCACTTAAATATTCGATTAAGACAGGAGT 551
      530      570      590
RHFNLSTCGDHWCLADAWL 601
CCGATTTCAATCACTGTGTCTACGATGAGGATATGTTGGATTAAGACAGGATGCT 601
      610      630      650
TSTANTNNFTYSLPVTFLTAC
TCGACCAACGACAAACACGACATCTTACGATTAGATCGCGCTGCTATTGTACTAC

```

[illegible]

【图 1-1】

1 2

• -5.7

【圖 3】

(図4)に示す

670 590 710  
 E Y V T L K K M R I I I G W P C G S G D  
 TGGAAATGTGACACATAAGAAAAATGAGGAAATCATTCGCTGCCCAGGAGGCTCTGGCG  
 730 750 770  
 G T F E P S C A I S N M Y A L I A R Y  
 ATGCAATCTCTCTCTCTGCTGGCATCCCAACATSTACGCCATGCTCATGCCCGCT  
 790 810 830  
 K M P E V K E K C M A A V P R L I A F  
 ATAAGATCTTCCAGAAATCAAGCAAAAGGGATGCCCGCGCTGCCCAGGCTCATGGCAT  
 850 870 890  
 S P S H F S I K K G A A L G G G T  
 TCACTGCACAGCATACTCACTTTCTCTCAAGCAAGGAGCTGCACGCTTGGGACTCGGA  
 910 930 950  
 D S V I L I K C D E R G K M I V S D L E  
 CACACAGCGCTGATTCTGATTAATATGTCTACAGAGAGAAAGATGCCCATCTGCACCTTG  
 970 990 1010  
 R R I L E V K K Q K G F V P F L V S A T A  
 AAAGAAATCTTGAAGTCAAAACAGAAAGGATTTGCTCTTCTCTCTGAGTGGCCACAA  
 1030 1050 1070  
 A A A A A A A T T T G A A G T C A A A C A G A A A G G A T T V T F C C T T G G T G A G T C A C A G  
 1090 1110 1130  
 G T T V Y G A F D P L L A V A D I C K K  
 CTGCAACCTACTCTGTACAGGAGCTTCTGATCTCTCTGGCTGTAGCTGACACTGCAAAA  
 1150 1170 1190  
 Y K I W M V D A A W G G C L L X S R X  
 AAATAAATATCTGGATGCATCTGGATGCTGCTTGGGCTGAGGCTTACTGATSTCTGGCA  
 1210 1230 1250  
 K K W A L N G V E R A N S V T W M P H K  
 AACCAAAATCGAAGCTCAACGGTGTGGAGAGAGGCGCAATCTGTGCATCGAATCGCAATCGCAAT  
 1270 1290 1310  
 M K M G V P L Q C S A L L V R E G G L N Q  
 AAATATGAGTCTTCTCTCTTCTGCAATGTTTCGCTCTCTCTGCTGAGAGAGAGGAGCTGATGC

【圖 12】

【圖 7】

〔附8〕(表)

[illegible]

Figure 1 consists of two dot plots side-by-side. The left plot is titled 'Students in the first group' and the right plot is titled 'Students in the second group'. Both plots have a horizontal axis representing the number of children per family, with tick marks from 0 to 10. The vertical axis represents frequency, with tick marks from 0 to 10.4. The data points are represented by dots, with the number of dots corresponding to the frequency of each number of children.

Number of Children	Frequency (First Group)	Frequency (Second Group)
0	0.9	1.9
1	1.6	2.5
2	2.0	2.8
3	2.2	3.0
4	3.3	3.5
5	7.5	3.8
6	10.3	4.2
7	8.8	5.3
8	8.0	6.1
9	4.7	5.4
10	4.4	5.1

70182

【图 1-3】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

-43

【图 6】

( 問題 9 ) に従く )

[illegible]

解開半: 7 7 0 1 8 2

(【周7】に於く)

[illegible]

[圖 8]

[illegible]

(22)

特開平7-70182

[図9]

ギャップウエイト: 2.000 平均マッチ: 0.540  
 レングスウエイト: 0.120 平均ミスマッチ: 0.384  
 クオリティ: 856.2 レンダース: 585  
 比 率: 1.464 ギャップ: 1  
 相対性パーセント: 91.436 同一性パーセント: 91.064  
 4811, P3P 00:2.767 1990年8月22日8時20分

```

1 MASPGSGVSTGSCDGGSPDMPGTARAVDVAQNF TGGTAMLCAL LYG 90
1 MASPGSGVSTGSCDGGSPDMPGTARAVDVAQNF TGGTAMLCAL LYG 90
51 ASDPAESGGSVTSRAATKVACTEDKPCSCPGDVAHYAL LWTDL LPA 100
51 ASDPAESGGSVTSRAATKVACTEDKPCSCPGDVAHYAL LWTDL LPA 100
101 CCGDPTLATDQVNHLLQVYKSFDRSTKYD DITMELLQVYHLLA 154
101 CCGDPTLATDQVNHLLQVYKSFDRSTKYD DITMELLQVYHLLA 150
151 DDPONLEELIHERITLKAYAKTQHPRYTQLS TGLDHYGLAADH TSIA 208
151 DDPONLEELIHERITLKAYAKTQHPRYTQLS TGLDHYGLAADH TSIA 200
201 NTHTFTEAPFTVLLCYVTLKQREI TSNYGGSGDGTSPGGA)SNHYA 250
201 NTHTFTEAPFTVLLCYVTLKQREI TSNYGGSGDGTSPGGA)SNHYA 250
251 HIAFTQFTVYKNGWYFPA LNTSDISHSJ KGAALGIGTBSV 300
251 HIAFTQFTVYKNGWYFPA LNTSDISHSJ KGAALGIGTBSV 300
301 LKCDERGGHPSDLEERRLEAKRGFVPLYSATAGTTVYGNF DPLAV 350
301 LKCDERGGHPSDLEERRLEAKRGFVPLYSATAGTTVYGNF DPLAV 350
351 ASICQYKIVHHVDAWGGELNGBEKQND NGVERHNSVTHNHQWLV 400
351 ASICQYKIVHHVDAWGGELNGBEKQND NGVERHNSVTHNHQWLV 400

```

(【図10】に続く)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 14/00

C 1 2 N 9/04

C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/53

33/573

// A 6 1 K 38/00

ABC

(C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 マーク ジー プーランダー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州

92024、エンシノニダス、ヴェア テラッ

サ 1352

(72) 発明者 ダニエル エル カーツマン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州

90404、サンタモニカ、ニールビーデュー

C、センテンネラ 1453

(72) 発明者 マイケル ジェイ クラレ、セルスラー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州

90068、ロサンジェルス、フロイド テラ

ク 3333

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.  
As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox